· 论著 ·

电针对缺血再灌注后学习记忆障碍大鼠 BDNF/TrkB/PI3K/Akt 通路的影响及对海马神经元保护作用的研究

苏凯奇[1]，吕转[1]，吴明莉[1]，罗萌[1]，高静[1]，聂晨晨[2]，刘昊[2]，冯晓东[1，2*]

【摘要】 **背景** 学习记忆障碍是脑卒中后常见的功能障碍，严重影响患者的整体康复。电针神庭、百会对脑卒中后认知功能障碍患者具有确切疗效，但其作用机制尚未十分明确。**目的** 观察电针对大脑中动脉缺血再灌注（MCAO/R）后学习记忆障碍大鼠海马神经元保护作用及对脑源性神经生长因子（BDNF）/ 酪氨酸受体激酶 B（TrkB）/ 磷脂酰肌醇 –3– 羟激酶（PI3K）/ 蛋白激酶 B（Akt）信号通路的影响。**方法** 2021 年 5 月—2022 年 3 月选取 60 只 8 周龄健康雄性 SD 大鼠，取 24 只大鼠分为空白组（*n*=12）、假手术组（*n*=12），其余 36 只大鼠构建 MCAO/R 模型。将造模成功的 24 只大鼠随机分为模型组（*n*=12）和电针组（*n*=12）。电针组于神庭、百会穴进行电针治疗，采用进行 Zea–Longa 评分观察各组大鼠神经功能缺损程度，采用空间探索实验评价大鼠空间学习记忆能力，采用 TTC 染色观察大鼠脑梗死体积。采用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应（RT–PCR）测定 BDNF、TrkB、PI3K、Akt mRNA 水平，Western Blot 检测 BDNF、TrkB 蛋白水平及 PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平。**结果** 术后 2 h 模型组、电针组 Zea–Longa 评分与空白组、假手术组差异有统计学意义（*P*<0.05），治疗第 7 天、治疗第 14 天模型组 Zea–Longa 评分与空白组、假手术组、电针组比较，差异有统计学意义（*P*<0.05）。治疗第 9~13 天模型组逃避潜伏期均大于假手术组（*P*<0.05），电针组均低于模型组（*P*<0.05）。模型组穿越平台有效区域次数低于空白组、假手术组（*P*<0.05），电针组高于模型组（*P*<0.05）。空白组、假手术组、模型组、电针组大鼠脑梗死体积分别为 0、0、（36.7±6.3）%、（24.0±2.2）%，电针组大鼠脑梗死体积低于模型组（*P*<0.05）。模型组 BDNF、TrkB、PI3K、Akt mRNA 水平低于空白组、假手术组（*P*<0.05），电针组 BDNF、TrkB、PI3K、Akt mRNA 水平高于模型组（*P*<0.05）。与假手术组相比，模型组 BDNF、TrkB 蛋白水平均下降（*P*<0.01；*P*<0.001），PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平下降（*P*<0.01；*P*<0.05）；与模型组相比，电针组 BDNF、TrkB 蛋白水平和 PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平均升高（*P*<0.05）。**结论** 电针可能通过上调 BDNF/TrkB/PI3K/Akt 通路相关蛋白表达，减轻神经功能缺损症状，改善脑缺血再灌注后学习记忆能力。

【关键词】 卒中；再灌注损伤；记忆障碍；电针疗法；CA1 区，海马；神经生长因子类

【中图分类号】 R 743 R 619.9 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007–9572.2023.0115

【引用本文】 苏凯奇，吕转，吴明莉，等．电针对缺血再灌注后学习记忆障碍大鼠 BDNF/TrkB/PI3K/Akt 通路的影响及对海马神经元保护作用的研究［J］．中国全科医学，2023.［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007–9572.2023.0115.［www.chinagp.net］

SU K Q，LYU Z，WU M L，et al. The effect of protection of electroacupuncture on hippocampal neurons and BDNF/TrkB/PI3K/Akt pathway in rats with learning and memory impairment after ischemia reperfusion［J］. Chinese General Practice，2023.［Epub ahead of print］.

Effect of Electroacupuncture on BDNF/TrkB/PI3K/Akt Pathway and Hippocampal Neuronal Protection in Rats with Learning and Memory Impairment after Ischemia Reperfusion

SU Kaiqi[1]，*Lyu Zhuan*[1]，*WU Mingli*[1]，*LUO Meng*[1]，*GAO Jing*[1]，*NIE Chenchen*[2]，*LIU Hao*[2]，*FENG Xiaodong*[1，2*]

1.Rehabilitation Center，the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine，Zhengzhou 450000，China

2.Department of Rehabilitation Medicine，Henan University of Chinese Medicine，Zhengzhou 450046，China

Corresponding author：FENG Xiaodong，Chief physician/Professor；E-mail：liuyubmu@163.com

【Abstract】 **Background** Learning and memory impairment is a common dysfunction after stroke，which seriously affects the overall recovery of patients. Electroacupuncture at Shenting and Baihui has definite efficacy in patients with cognitive dysfunction after stroke，but its mechanism of action remains uncertain. **Objective** To observe the effect of electroacupuncture

基金项目：国家自然科学基金联合基金项目（U2004131）；国家自然科学基金面上项目（82174473）

1.450000 河南省郑州市，河南中医药大学第一附属医院康复中心 2.450046 河南省郑州市，河南中医药大学康复医学院

*通信作者：冯晓东，主任医师 / 教授；E-mail：fxd0502@163.com

on hippocampal neuronal protection and brain-derived nerve growth factor (BDNF)/tyrosine receptor kinase B (TrkB)/phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway in rats with learning and memory impairment after middle cerebral artery occlusion reperfusion (MCAO/R). **Methods** A total of 60 8-week-old healthy male SD rats were selected from May 2021 to March 2022, and 24 rats were divided into the blank group (n=12) and sham operation group (n=12), and the other 36 rats were constructed as MCAO/R model. The 24 rats with successful modeling were randomly divided into the model group (n=12) and electroacupuncture group (n=12). The electroacupuncture treatment was performed at Shenting and Baihui points in the electroacupuncture group. Zea-Longa score was used to observe the degree of neurological impairment in each group. Spatial probe test was used to evaluate the spatial learning and memory ability of the rats. TTC staining was used to observe the volume of brain infarction in rats. Real-time fluorescent quantitative polynucleotide chain reaction (RT-PCR) was used to measure the mRNA levels of BDNF, TrkB, PI3K and Akt, Western Blot was used to detect the protein levels of BDNF and TrkB and the phosphorylation levels of PI3K and Akt. **Results** Zea-Longa score of the model group and electroacupuncture group was significantly different from the blank group and sham operation group at 2 h after surgery (P<0.05), and Zea-Longa score of the model group was significantly different from the blank group, sham operation group and electroacupuncture group at 7 and 14 days after treatment (P<0.05). During the 9th to 13th day of treatment, the escape latency in the model group was higher than the sham operation group (P<0.05), and lower in the electroacupuncture group than the model group (P<0.05). The frequency of crossing the effective region of the platform in the model group was lower than the blank group and sham operation group (P<0.05), and higher in the electroacupuncture group than the model group (P<0.05). The volume of cerebral infarction in blank group, sham operation group, model group and electroacupuncture group was 0, 0, (36.7 ± 6.3)% and (24.0 ± 2.2)%, respectively, and the volume of cerebral infarction in the electroacupuncture group was lower than the model group (P<0.05). The mRNA levels of BDNF, TrkB, PI3K and Akt in the model group were lower than the blank group and sham operation group (P<0.05), and higher in the electroacupuncture group than the model group (P<0.05). Compared with sham operation group, the protein levels of BDNF and TrkB (P<0.01; P<0.001), the phosphorylation levels of PI3K and Akt (P<0.01; P<0.05) in model group were decreased; compared with the model group, the protein levels of BDNF and TrkB and the phosphorylation levels of PI3K and Akt in electroacupuncture group were increased (P<0.05). **Conclusion** Electroacupuncture may reduce the symptom of neurological function deficits and improve the learning and memory ability of rats after cerebral ischemia reperfusion by upregulating the expression of BDNF/TrkB/PI3K/Akt pathway related proteins.

【Key words】 Stroke; Reperfusion Injury; Memory disorders; Electroacupuncture therapy; CA1 region, hippocampal; Nerve growth factors

脑卒中是我国人口寿命年减少的首要病因，缺血性脑卒中约占其中的87%[1-2]。脑卒中患者常存在不同程度的功能障碍，其中约2/3的患者出现执行功能/注意力、记忆、视空间等至少1个领域的认知功能下降，严重影响患者的依从性和整体康复[3-4]。本课题组前期研究发现，神庭和百会是针刺治疗脑卒中后认知障碍常用的穴位[5]，同时电针神庭、百会能够有效改善卒中后患者认知功能，提高生活自理能力[6-7]，然而具体的作用机制仍需深入研讨。脑源性神经营养因子（BDNF）可促进神经细胞发育、成熟，在维持神经元存活、增加神经递质的合成中具有重要作用[8-9]。BDNF与其特异性受体酪氨酸激受体B（TrkB）结合后，可激活下游磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）信号通路，与细胞凋亡、自噬、突触可塑性密切相关[8, 10-11]。基于此，本研究通过构建大脑中动脉阻塞再灌注（MCAO/R）后学习记忆障碍大鼠模型，观察了电针对大鼠海马神经元的保护作用及对BDNF/TrkB/PI3K/Akt信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2021年5月—2022年3月选取60只8周龄健康雄性SD大鼠，体质量180~220 g，SPF级，购自济南朋悦实验动物繁育有限公司〔动物许可证号：SCXK（鲁）2019003〕。饲养于河南中医药大学第一附属医院实验动物中心，保持室温20~26 ℃，湿度50%~70%，12 h光照，自由饮食、饮水。本研究严格遵循实验动物伦理保护规定执行，并通过河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会的批准（YFYDW2021030）。

1.2 主要试剂和仪器 戊巴比妥钠（上海氰德化工有限公司，货号：21642-83-1），硫酸庆大霉素〔上海现代哈森（商丘）药业有限公司，货号：1405-41-0〕，线栓（北京西浓科技有限公司，货号：2036A6），多聚甲醛（biosharp生物科技，货号：BL539A），中性树胶（中国医药集团有限公司，货号：96949-21-2），2%（2，3，5-氯化三苯基四氮唑）TTC染色液（北京索莱宝科技有限公司，货号：T8170），总RNA提取试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，货号：R1200），

蛋白提取试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，货号：R0010），BCA 蛋白定浓度测定试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，货号：PC0020），彩虹光谱蛋白 Marker（北京索莱宝科技有限公司，货号：PR1920）、增强型化学发光（ECL）显色液（北京索莱宝科技有限公司，货号：PE0010），逆转录试剂盒〔翌圣生物科技（上海）股份有限公司，货号：14601ES03〕，引物（金唯智生物科技公司），兔抗 BDNF（美国 Abcam，货号：ab108319），TrkB 多克隆抗体（美国 Abcam，货号：ab187041），辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔 IgG 二抗（美国 Abcam，货号：ab150077），兔抗磷酸化下游磷脂酰肌醇 3 激酶（p-PI3K）（美国 Abcam，货号：ab278545），PI3K（美国 Abcam，货号：ab133595），磷酸化蛋白激酶 B（p-Akt）（武汉三鹰生物技术有限公司，货号：80455-1-RR），Akt（武汉三鹰生物技术有限公司，货号：6-2-3-2-lg），GAPDH 多克隆抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，货号：60004-1-lg），PAGE 凝胶试剂盒（上海雅酶生物医药科技有限公司，货号：PG112）。

Morris 水迷宫（深圳市瑞沃德生命科技有限公司），针灸针、电针仪（苏州医疗用品厂），病理切片机（德国徕卡，型号：RM2245），脱水机（德国莱卡公司，型号：ASP200S），包埋机（武汉俊杰电子有限公司，型号：JB-L7），高速组织研磨仪（武汉 Servicebio，型号：SWE-FP），PCR 仪（杭州比格飞序，型号：96B），蛋白浓度微量测定仪（美国 Thermo，型号：NanoDropOne），荧光定量 PCR 仪（西安天隆科技，型号：Gentier），酶标仪（美国 Thermo，型号：MK3），电泳仪、转膜仪（美国 Bio-Rad，型号：1658001，170-3930），凝胶成像系统（美国 Bio-Rad，型号：GelDoc XR+）。

1.2.3 大鼠造模及分组 喂养 1 周后称重，按照体质量生成的随机数字表进行分组，取 24 只大鼠分为空白组（n=12）、假手术组（n=12），其余 36 只大鼠采用 Zea Longa 线栓法构建 MCAO/R 模型[12]。大鼠术前禁食 12 h，3% 戊巴比妥钠（30 mg/kg）腹腔注射麻醉，取仰卧位，分离颈总动脉（CCA）、颈内动脉（ICA）和颈外动脉（ECA），结扎 ECA 远心端，夹闭 CCA 近心端和 ICA 远心端，在 ECA 分叉处剪一"V"形开口，用（0.26±0.02）mm 的硅胶涂层尼龙线栓从切口处插入至 ICA 夹闭处，松掉 ICA 动脉夹，继续插入至轻微阻力为止，深度约 1.8~2.0 cm，记录插栓时间，缝合切口。术后腹腔注射庆大霉素（2U/ 只），连续 3 d。缺血 2 h 后，轻轻拉出长度约 1 cm 线栓，复通血管以灌注。空白组仅予同等条件的捉抓，假手术组予麻醉后仅分离血管，不插栓。待假手术组和造模后的大鼠完全清醒后对大鼠进行 Zea-Longa 评分（具体标准见表 1），排除 0 和 4 分的大鼠，24 h 后对假手术组和剩余造模大鼠开展水迷宫定位航行实验。以假手术组平均逃避潜伏时间为参考值，若造模组大鼠平均逃避潜伏时间小于参考值的 80%，则认为造模成功[13]。最终将造模成功的 24 只大鼠随机分为模型组（n=12）和电针组（n=12）。

表 1 Zea-Longa 评分标准
Table 1 Zea-Longa scoring criteria

评分	表现
0 分	无缺损症状；无神经损伤
1 分	提尾时对侧前肢内收屈曲；轻度神经损伤
2 分	向对侧追尾式旋转；中度神经损伤
3 分	行走费力且向对侧倾倒；重度神经损伤
4 分	不能自发活动伴意识丧失；极重度神经损伤

1.2.4 电针治疗 电针组于神庭、百会穴进行电针治疗，腧穴定位依照《实验针灸学》[14]。将大鼠置于特殊制作的治疗架上，采用针灸针（0.3 mm×25 mm）向后斜刺 3 mm 进针，连接 GM01 电针仪，选用疏密波，电压峰值 6 V，频率 2~10 Hz，电流强度 1~3 mA。30 min/ 次，1 次 /d，连续治疗 14 d。治疗期间关注大鼠状态，避免针灸针脱落和大鼠跌落摔伤。模型组、空白组、假手术组只给予同等条件抓取，不予其他干预措施。

1.2.5 大鼠神经缺损程度与空间学习记忆能力评价 治疗后第 7、14 天由对实验方案不知情的人员对大鼠进行 Zea-Longa 评分，以此观察各组大鼠神经功能缺损程度。通过水迷宫实验评价大鼠空间学习记忆能力，包括（1）定位航行实验：于治疗第 9~13 天 8：00 及 18：00 进行，由第 1 象限开始按顺时针顺序依次将大鼠置入水中，大鼠通过游泳来寻找逃生平台，记录大鼠发现平台所花费的时间（逃避潜伏期）。90 s 内未能找到平台，由研究者将大鼠置于平台上，并给予 10 s 的休息时间，并记录此大鼠的逃避潜伏期为 90 s。（2）空间探索实验：在治疗进行第 14 天时撤掉水池中的逃生平台，其余不变，将大鼠面朝池壁，依次投放入水池内的 4 个象限，记录 90s 内穿越平台有效区域次数。

1.2.6 TTC 染色观察大鼠脑梗死体积 治疗结束后，每组随机选 3 只大鼠麻醉后断头取脑组织，冲洗干净，于 -20 ℃冰箱中快速冷冻 20 min 后沿冠状面进行切片，切片厚度约 2 mm，每个脑组织共切 5 片。于 2%TTC 染色液中 37 ℃避光染色。染色后将脑切片按照顺序摆放后拍照，应用 Image J 软件计算脑梗死体积。

1.2.7 HE 染色观察海马 CA1 区神经元形态 干预结束后，每组随机选 3 只大鼠，麻醉后生理盐水和多聚甲醛心脏灌注，断头取脑组织，多聚甲醛固定，脱水后石蜡包埋切片。56 ℃烤片 1 h，脱蜡步骤如下：切片置于松

节油中 8 min，4 次，然后于乙醇中梯度脱水。使用苏木素染色 5~10 min，采用纯水将切片清洗至水色变清，使用1%盐酸酒精分化2~3 s后使用纯水清洗，氨水返蓝，再次清洗。1% 伊红染色 5~10 min，清洗 1 min，乙醇脱水后中性树胶封片待检。

1.2.8 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应（RT-PCR）测定 BDNF、TrkB、PI3K、Akt mRNA 水平 干预结束后，每组随机选 3 只大鼠，完全麻醉后取脑，在冰面上剥取海马组织，置于无酶冻存管中 -80 ℃冰箱保存。按 100 mg 海马组织 ∶ 1 mL 裂解液比例配置，匀浆器充分研磨，按照试剂盒说明书提取总 RNA，置于冰上进行 RNA 浓度测定。引物序列见表 2。逆转录条件为 37 ℃，15 min，98 ℃，5 min，结束后分装并 -20 ℃保存。RT-PCR 条件与方法按照说明书进行，基因相对表达量采用 2- △△ CT 法计算。

表 2 RT-PCR 引物序列
Table 2 RT-PCR primer sequence

基因	引物序列（5′→3′）
BDNF	F：GACTCCCCGGCTTGGAGAAG R：CTGAGGGAACCCGGTCTCAT
TrkB	F：GGATTCTGCCTGCTGGTGAT R：ACCCATCCAGGGGGATCTTAT
PI3K	F：ATCGACCTACACTTGGGGGA R：CAATATCTTCTGGCCGGGCT
Akt	F：AGGAGGTCATCGTTGCCAAG R：GGTCGTGGGTCTGGAATGAG
GAPDH	F：ACAGCAACAGGGTGGTGGAC R：TTTGAGGGTGCAGCGAACTT

注：BND*F*= 神经营养因子，TrkB= 酪氨酸激受体 B，PI3K= 磷脂酰肌醇 3 激酶，Akt= 蛋白激酶 B。

1.2.9 Western Blot 检测 BDNF、TrkB 蛋白水平及 PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平 干预结束后，每组随机选 3 只大鼠，完全麻醉后取脑，在冰面上剥取海马组织，置于无酶冻存管中 -80 ℃冰箱保存。海马组织称重后，加入裂解混合液（RIPA 裂解液 ∶ 蛋白酶抑制剂 ∶ 蛋白磷酸酶抑制剂 =100 ∶ 1 ∶ 1）。使用匀浆器低温充分研磨，4℃，12 000 rpm 离心 15 min 后提取上清，采用 BCA 法测定蛋白浓度，加入上样缓冲液后加热变性。制备 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶，电泳，湿法转膜，封闭 1.5~2 h。4 ℃一抗（BDNF1 ∶ 7 000、TrkB 1 ∶ 5 000、p-PI3K 1 ∶ 1 000、PI3Kl ∶ 1 000、p-Akt 1 ∶ 1 000、Akt 1 ∶ 1 000、GAPDH 1 ∶ 10 000）孵育过夜。二抗（1 ∶ 10 000）室温孵育 1 h。ECL 法显影，凝胶成像拍照。使用 Image J 软件并以目的蛋白 / 内参灰度值计算蛋白相对表达量，PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平分别以 p-PI3K/ 磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶（p-PI3K）、p-Akt/ 磷酸化蛋白激酶 B（p-Akt）表示。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计学软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用 LSD-*t* 检验；重复测量数据采用两因素重复测量方差分析；等级资料比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验，组内两两比较采用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠神经功能缺损程度 术后 2 h 模型组、电针组 Zea-Longa 评分与空白组、假手术组差异有统计学意义（$P<0.05$），治疗第 7 天、治疗第 14 天模型组 Zea-Longa 评分与空白组、假手术组、电针组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 3。

2.2 4 组大鼠学习记忆能力比较 定位航行实验的重复测量方差分析结果显示，时间、组别主效应及时间与组别的交互效应。简单效应分析，以时间为自变量的效应分析结果显示，在治疗第 9 天、第 10 天、第 11 天、第 12 天、第 13 天逃避潜伏期比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。以组别为自变量的效应分析结果显示，治疗第 9~13 天 4 组大鼠逃避潜伏期比较差异有统计学意义（$P<0.05$），第 9~13 天模型组均大于假手术组（$P<0.05$），电针组均低于模型组（$P<0.05$），见表 4。

表 3 4 组大鼠 Zea-Longa 评分比较
Table 3 Comparison of Zea-Longa scores among 4 groups of rats

组别	例数	术后 2 h					治疗第 7 天					治疗第 14 天				
		0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
空白组	12	12（100.0）	0	0	0	0	12（100.0）	0	0	0	0	12（100.0）	0	0	0	0
假手术组	12	12（100.0）	0	0	0	0	12（100.0）	0	0	0	0	12（100.0）	0	0	0	0
模型组[abcdef]	12	0	1（8.3）	2（16.7）	9（75.0）	0	0	2（16.7）	3（25.0）	7（58.3）	0	0	3（25.0）	7（58.3）	2（16.7）	0
电针组[abgh]	12	0	1（8.3）	3（25.0）	8（66.7）	0	0	6（50.0）	4（33.3）	2（16.7）	0	4（33.3）	7（58.3）	1（8.3）	0	0
H 值		42.53					42.17					37.81				
P 值		<0.05					<0.05					<0.05				

注：[a] 表示术后 2 h 与空白组比较 $P<0.05$，[b] 表示术后 2 h 与假手术组比较 $P<0.05$，[c] 表示治疗第 7 天与空白组比较 $P<0.05$，[d] 表示治疗第 7 天与假手术组比较 $P<0.05$，[e] 表示治疗第 14 天与空白组比较 $P<0.05$，[f] 表示治疗第 14 天与假手术组比较 $P<0.05$，[g] 表示治疗第 7 天与模型组比较 $P<0.05$，[h] 表示治疗第 14 天与模型组比较 $P<0.05$。

空间探索实验结果表明，4 组大鼠穿越平台有效区域次数比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中模型组穿越平台有效区域次数低于空白组、假手术组（P<0.05），电针组高于模型组（P<0.05），见表 5。

表 4 4 组大鼠逃避潜伏期比较（$\bar{x} \pm s$，s）

Table 4 Comparison of incubation period among 4 groups of rats

组别	例数	第 9 天	第 10 天	第 11 天	第 12 天	第 13 天
空白组	12	38.6 ± 5.0	31.1 ± 5.9	25.8 ± 4.5	13.9 ± 3.7	8.4 ± 3.3
假手术组	12	37.7 ± 7.2	31.4 ± 6.2	25.1 ± 5.6	14.0 ± 4.2	8.2 ± 3.4
模型组	12	51.9 ± 6.3[ab]	42.4 ± 6.0[ab]	34.5 ± 5.0[ab]	27.5 ± 5.1[ab]	20.7 ± 5.9[ab]
电针组	12	46.5 ± 6.2[c]	37.6 ± 5.1[c]	29.5 ± 4.9[c]	20.4 ± 3.3[c]	12.4 ± 4.2[c]
F 值	$F_{交互}$=1.191，$F_{组间}$=52.513，$F_{时间}$=277.985					
P 值	$P_{交互}$=0.296，$P_{组间}$<0.05，$P_{时间}$<0.05					

注：[a] 表示与空白组比较 P<0.05，[b] 表示与假手术组比较 P<0.05，[c] 表示与模型组比较 P<0.05。

表 5 4 组大鼠穿越平台有效区域次数比较（$\bar{x} \pm s$，次）

Table 5 Comparison of times of crossing the effective region of the platform among 4 groups of rats

组别	例数	穿越平台次数
空白组	12	7.99 ± 2.71
假手术组	12	7.64 ± 3.20
模型组	12	2.19 ± 1.52[ab]
电针组	12	4.87 ± 1.65[c]

注：[a] 表示与空白组比较 P<0.05，[b] 表示假手术组比较 P<0.05；[c] 表示与模型组比较 P<0.05。

2.3 4 组大鼠脑梗死体积比较　空白组、假手术组、模型组、电针组大鼠脑梗死体积分别为 0、0、(36.7 ± 6.3)%、(24.0 ± 2.2)%，电针组大鼠脑梗死体积低于模型组（P<0.05），4 组大鼠脑组织 TTC 染色情况见图 1。

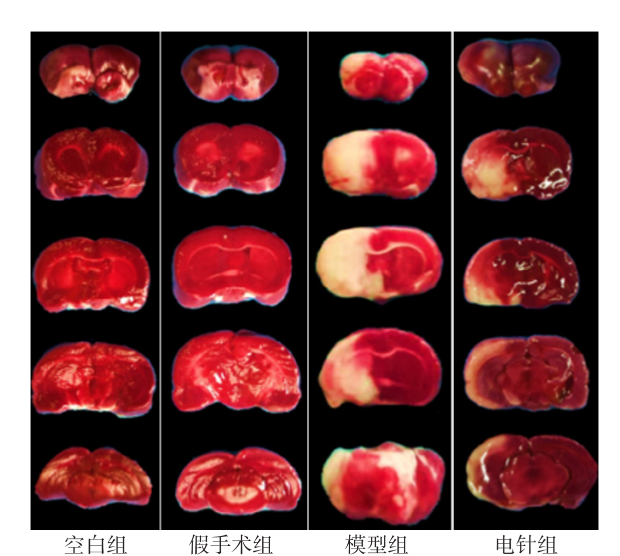


图 1 4 组大鼠脑组织 TTC 染色

Figure 1 TTC staining of brain tissue in 4 groups of rats

2.4 4 组大鼠海马 CA1 区神经元形态　空白组和假手术组 CA1 区神经元排布紧致，胞质均匀、颜色均匀，核显示清楚，形态规整；模型组神经元数目稀少，大小、形态各异，胞膜完整性差，部分变形、肿胀、破裂，胞质颜色偏深，分布不均，核深染固缩，核仁显示不清；电针组神经元数目较模型组增多，排列较为密集规整，形态规则，膜和核仁清晰可见，胞质分布均匀，见图 2。

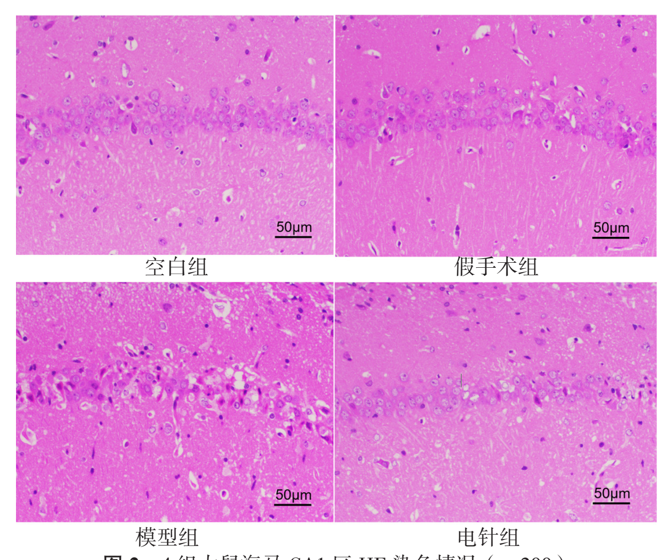


图 2 4 组大鼠海马 CA1 区 HE 染色情况（×200）

Figure 2 HE staining in hippocampal CA1 region of 4 groups

2.5 4 组大鼠海马组织 BDNF、TrkB、PI3K、Akt mRNA 水平比较　4 组大鼠 BDNF、TrkB、PI3K、Akt mRNA 水平比较，差异有统计学意义（P<0.05），其中模型组 BDNF、TrkB、PI3K、Akt mRNA 水平低于空白组、假手术组（P<0.05），电针组 BDNF、TrkB、PI3K、Akt mRNA 水平高于模型组（P<0.05），见表 6。

表 6 4 组大鼠海马组织 BDNF、TrkB、PI3K、Akt mRNA 水平比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 6 Comparison of mRNA levels of BDNF，TrkB，PI3K and Akt in hippocampal tissues of four groups

组别	例数	BDNF	TrkB	PI3K	Akt
空白组	3	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.20
假手术组	3	0.99 ± 0.04	1.00 ± 0.02	1.03 ± 0.10	1.00 ± 0.10
模型组	3	0.23 ± 0.03[ab]	0.48 ± 0.10[ab]	0.55 ± 0.04[ab]	0.53 ± 0.05[ab]
电针组	3	0.76 ± 0.08[c]	0.75 ± 0.07[c]	0.88 ± 0.16[c]	0.90 ± 0.09[c]
F 值		91.95	44.87	11.45	10.35
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注：[a] 表示与空白组比较 P<0.05，[b] 表示与假手术组比较 P<0.05；[c] 表示与模型组比较 P<0.05。

2.6 4 组大鼠海马组织 BDNF、TrkB 蛋白水平及 PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平比较　空白组与假手术组 BDNF、TrkB 蛋白水平及 PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平无差异（P>0.05）；与假手术组相比，模型组 BDNF、

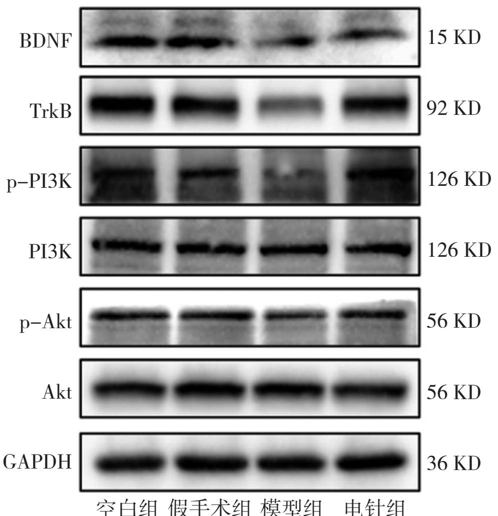
TrkB 蛋白水平均下降（$P<0.01$；$P<0.001$），PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平下降（$P<0.01$；$P<0.05$）；与模型组相比，电针组 BDNF、TrkB 蛋白水平和 PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平均升高（$P<0.05$）。见图 2、表 7。

表 7 4 组大鼠海马组织 BDNF、TrkB、PI3K、Akt 蛋白相对表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 6 Comparison of protein relative expression levels of BDNF, TrkB, PI3K and Akt in hippocampal tissues of four groups

组别	例数	BDNF	TrkB	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
空白组	3	0.32 ± 0.07	0.95 ± 0.04	0.58 ± 0.01	0.33 ± 0.03
假手术组	3	0.32 ± 0.07	0.91 ± 0.06	0.59 ± 0.04	0.35 ± 0.03
模型组	3	0.08 ± 0.03[ab]	0.43 ± 0.02[ab]	0.31 ± 0.10[ab]	0.17 ± 0.02[ab]
电针组	3	0.23 ± 0.07[c]	0.65 ± 0.06[c]	0.54 ± 0.09[c]	0.32 ± 0.09[c]
F 值		10.58	45.22	10.66	7.62
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注：p-PI3K= 磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶，p-Akt= 磷酸化蛋白激酶 B；[a] 表示与空白组比较 $P<0.05$，[b] 表示与假手术组比较 $P<0.05$；[c] 表示与模型组比较 $P<0.05$。



注：BND*F*= 神经营养因子，TrkB= 酪氨酸激受体 B，PI3K= 磷脂酰肌醇 3 激酶，Akt= 蛋白激酶 B，p-PI3K= 磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶，p-Akt= 磷酸化蛋白激酶 B，GADPH= 磷酸甘油酸脱氢酶。

图 3 4 组大鼠海马组织 BDNF、TrkB、PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt 蛋白质印迹法蛋白条带图

Figure 3 Protein bands of BDNF, TrkB, PI3K, Akt, p-PI3K, p-Akt in the hippocampus of the four groups of rats by Western Blotting

3 讨论

脑卒中后认知功能障碍归属于中医学“呆病”“健忘”等范畴。现代医家认为本病病位在脑，病机为脑脉痹阻、脑髓失养。患者因邪致气血不畅，痰瘀闭阻清窍，脑髓不充而神识不清，表现为表情呆滞、学习记忆力下降等[15]。本研究团队基于该病“病位在脑，首取督脉”的学术思想，在前期文献研究的基础上，总结出以电针神庭、百会为主的通督醒神针刺疗法，在临床应用广泛，疗效显著[5]。神庭为督脉、足太阳、阳明之会，对于神智方面的疾病，非神庭莫能治。百会位居巅顶，贯通周身经穴，是调节大脑功能的要穴。前期研究发现，电针神庭、百会能够有效改善卒中后患者认知功能，提高生活自理能力[6-7]。

海马与学习记忆、情绪等高级脑活动密切相关。正常情况下，短时记忆储存在海马中，大脑通过重复和强化后将部分短时记忆转变为永久性记忆储存在大脑中。而当各种原因导致海马损伤时，机体则会出现不同程度的学习和记忆功能的障碍。因此，海马常被用来研究与学习记忆有关的生理机制。其次，海马神经元对缺血缺氧异常敏感，因此海马也是研究最多的与脑卒中后学习记忆障碍有关的脑区[16-17]。本研究发现，MCAO/R 大鼠海马 CA1 区神经元广泛溶解、数目稀少、细胞结构模糊不清，同时神经功能缺损评分及行为学观察发现大鼠存在不同程度的学习记忆功能减退，与海马神经元的损伤程度密切相关。

BDNF 作为哺乳动物中枢内分布最为广泛、含量最高的营养因子，对神经元形成、功能重塑以及情绪、学习和记忆等功能的发挥具有重要作用[18-19]。BDNF 表达异常可导致神经元轴突和树突的生长受限，影响突触信号传递，进而导致神经系统疾病的发生，如神经退行性病变、神经疼痛、抑郁、癫痫等。同样，海马 BDNF 的表达差异与其结构和功能相关。有研究发现，敲除 BDNF 基因可引起小鼠认知功能障碍，甚至导致小鼠死亡[20]。向大鼠脑室内注射 BDNF 能够预防缺血海马 CA1 区神经元死亡，促进 DG 区颗粒细胞的生长与成熟，增强海马突触后受体活性，从而改善神经功能[21]。

BDNF 对中枢神经系统的调控作用是依赖于与其下游高亲和力受体 TrkB 结合后，TrkB 可发生二聚体化，继而引发下游 PI3K/Akt 信号通路的激活。BDNF/TrkB 介导的 PI3K/Akt 信号级联反应在突触重塑、神经元形成以及情绪、学习和记忆神经发育及相关疾病中发挥着重要作用。PI3K/Akt 信号通路是广泛存在于细胞内重要的生存信号传导通路之一，其激活与细胞增殖、分化密切相关。在神经系统损伤中起着非常重要的作用[22]。LI 等[23]采用甲叉丙烯酰胺（1-oxy-2-Pyridinethiolato）干预局灶性脑缺血后大鼠模型，结果发现治疗组大鼠海马组织 PI3K 信号通路被激活，同时水迷宫检测发现大鼠认知功能提高，说明通过调控 PI3K 信号通路可以改善脑缺血缺氧大鼠的认知能力。本研究结果显示，MCAO/R 模型大鼠海马 BDNF、TrkB、PI3K、Akt 水平下降，学习记忆能力受损，神经元损伤明显，而电针干预能够提高 BDNF、TrkB、PI3K、Akt 水平，改善学习记忆能力，这可能与电针提高该通路水平、增强海马突触可塑性有关，然而仍需要进一步研究验证。此外，mTOR 作为 PI3K/Akt 通路的下游关键蛋白，是自噬的

关键调节剂，那么电针疗法是否是通过影响 BDNF/TrkB 介导的 PI3K/Akt/mTOR 信号级联反应调控了海马神经元的自噬水平而发挥作用的，以及自噬与突触可塑性的关系如何仍有待后续进一步研究。

作者贡献：苏凯奇负责文章的构思设计及论文的撰写；苏凯奇、吕转、罗萌、聂晨晨、刘昊负责动物实验实施、数据收集整理；吴明莉、高静负责实验管理及数据分析；冯晓东负责文章的质量控制及终稿的审校，对论文负责。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] GBD CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global，regional，and national age-sex specific mortality for 264 causes of death，1980-2016：a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016［J］. Lancet，2017，390（10100）：1151-1210. DOI：10.1016/S0140-6736（17）32152-9.

[2] KLEINDORFER D O，TOWFIGHI A，CHATURVEDI S，et al. 2021 guideline for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack：a guideline from the American heart association/American stroke association［J］. Stroke，2021，52（7）：e364-e467. DOI：10.1161/STR.0000000000000375.

[3] 中国卒中学会，卒中后认知障碍管理专家委员会. 卒中后认知障碍管理专家共识［J］. 中国卒中杂志，2017，12（6）：519-531. DOI：10.3969/j.issn.1673-5765.2017.06.011.

[4] 高静，白艳杰，冯晓东.《欧洲卒中组织与欧洲神经病学学会卒中后认知障碍的联合指南》解读［J］. 华西医学，2022，37（5）：641-645. DOI：10.7507/1002-0179.202204020.

[5] 苏凯奇，高静，李洁莹，等. 基于古今医案云平台分析针刺治疗中风后认知障碍选穴规律［J］. 中国针灸，2022，42（1）：99-103. DOI：10.13703/j.0255-2930.20201123-k0001.

[6] 刘娇，冯晓东. 电针百会、神庭穴配合康复训练治疗脑卒中后认知障碍临床研究［J］. 中医学报，2013，28（4）：608-610.

[7] 薛洋，孙伟娟，刘飞来，等. 电针神庭、百会联合功能康复训练治疗脑卒中后认知障碍 42 例［J］. 中医研究，2018，31（1）：57-60. DOI：10.3969/j.issn.1001-6910.2018.01.25.

[8] NIKOLETOPOULOU V，SIDIROPOULOU K，KALLERGI E，et al. Modulation of autophagy by BDNF underlies synaptic plasticity［J］. Cell Metab，2017，26（1）：230-242.e5. DOI：10.1016/j.cmet.2017.06.005.

[9] COLUCCI-D'AMATO L，SPERANZA L，VOLPICELLI F. Neurotrophic factor BDNF，physiological functions and therapeutic potential in depression，neurodegeneration and brain cancer［J］. Int J Mol Sci，2020，21（20）：7777. DOI：10.3390/ijms21207777.

[10] LI L X，CHU J H，CHEN X W，et al. Selenium ameliorates mercuric chloride-induced brain damage through activating BDNF/TrKB/PI3K/AKT and inhibiting NF-κB signaling pathways［J］. J Inorg Biochem，2022，229：111716. DOI：10.1016/j.jinorgbio.2022.111716.

[11] WANG H L，LIU F L，LI R Q，et al. Electroacupuncture improves learning and memory functions in a rat cerebral ischemia/reperfusion injury model through PI3K/Akt signaling pathway activation［J］. Neural Regen Res，2021，16（6）：1011-1016. DOI：10.4103/1673-5374.300454.

[12] LONGA E Z，WEINSTEIN P R，CARLSON S，et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats［J］. Stroke，1989，20（1）：84-91. DOI：10.1161/01.str.20.1.84.

[13] 黎帅，谭洁，张泓，等. 穴位埋线对慢性缺血性认知障碍模型大鼠空间学习记忆能力及海马兴奋性氨基酸毒性相关蛋白的影响［J］. 针刺研究，2018，43（6）：347-352. DOI：10.13702/j.1000-0607.170385.

[14] 李忠仁. 实验针灸学［M］. 2 版. 北京：中国中医药出版社，2007.

[15] 詹杰，潘锐焕，郭友华，等. 针刺百会、神庭联合基础治疗和常规康复训练治疗脑卒中后认知障碍：随机对照研究［J］. 中国针灸，2016，36（8）：803-806. DOI：10.13703/j.0255-2930.2016.08.007.html.

[16] WANG D P，YIN H，LIN Q，et al. Andrographolide enhances hippocampal BDNF signaling and suppresses neuronal apoptosis，astroglial activation，neuroinflammation，and spatial memory deficits in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion［J］. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，2019，392（10）：1277-1284. DOI：10.1007/s00210-019-01672-9.

[17] XING Y，ZHANG M，LI W B，et al. Mechanisms involved in the neuroprotection of electroacupuncture therapy for ischemic stroke［J］. Front Neurosci，2018，12：929. DOI：10.3389/fnins.2018.00929.

[18] SAHAY A S，JADHAV A T，SUNDRANI D P，et al. Differential expression of nerve growth factor（NGF）and brain derived neurotrophic factor（BDNF）in different regions of normal and preeclampsia placentae［J］. Clin Exp Hypertens，2020，42（4）：360-364. DOI：10.1080/10641963.2019.1665677.

[19] 高静，赖名殷，梅氏清心，等. 电针对抑郁大鼠前额叶脑源性神经营养因子 / 哺乳动物雷帕霉素复合物 1 通路及突触可塑性的影响［J］. 针刺研究，2022，47（1）：15-20，32. DOI：10.13702/j.1000-0607.201293.

[20] MOKHTARI T，AKBARI M，MALEK F，et al. Improvement of memory and learning by intracerebroventricular microinjection of T3 in rat model of ischemic brain stroke mediated by upregulation of BDNF and GDNF in CA1 hippocampal region［J］. Daru，2017，25（1）：4. DOI：10.1186/s40199-017-0169-x.

[21] WANG L，CHANG X Y，SHE L，et al. Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons［J］. J Neurosci，2015，35（22）：8384-8393. DOI：10.1523/jneurosci.4682-14.2015.

[22] WANG S S，ZHU M Y，WANG Q Y，et al. Alpha-fetoprotein inhibits autophagy to promote malignant behaviour in hepatocellular carcinoma cells by activating PI3K/AKT/mTOR signalling［J］. Cell Death Dis，2018，9（10）：1027. DOI：10.1038/s41419-018-1036-5.

[23] LI W Y，YANG Y，HU Z Y，et al. Neuroprotective effects of DAHP and Triptolide in focal cerebral ischemia via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR pathway activation［J］. Front Neuroanat，2015，9：48. DOI：10.3389/fnana.2015.00048.

（收稿日期：2023-02-01；修回日期：2023-05-28）

（本文编辑：邹琳）